

Cruz das Almas, BA
Fevereiro, 2016

Autores

**Harllen Sandro
Alves Silva**

Embrapa Mandioca e
Fruticultura, Cruz das
Almas, BA

Rosiane S. Vieira

Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia,
Cruz das Almas, BA

**Karoline G. V.
Cardoso**

Universidade Estadual
de Feira de Santana,
Feira de Santana, BA

Kaliane S. Araújo

Universidade Federal de
Viçosa, Viçosa, MG

Processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira por microbiolização com rizobactérias produtoras de ácido indolacético

Introdução

A propagação da bananeira pode ser realizada vegetativamente, e, no caso de algumas espécies, por sementes, sendo a maioria dos plantios realizados com mudas retiradas de brotos laterais de plantas adultas (ALVES et al., 2004; NELSON, 2006). No entanto, este sistema convencional pode comprometer a qualidade fitossanitária das mudas, uma vez que a maioria das doenças pode ser disseminada pelos rebentos, limitando, assim, os ganhos com a cultura (PEREIRA, et al., 2005). Dessa forma, a técnica da micropropagação tem sido empregada na produção de mudas sadias e em maior número que os métodos convencionais (LIMA et al., 2003).

A obtenção de mudas via micropropagação é muito superior se comparada aos diferentes métodos de propagação vegetativa. Enquanto no processo convencional são necessários 12 meses para obtenção de 10 a 30 mudas dependendo do genótipo utilizado, cerca de dez vezes mais mudas são obtidas em quase metade do tempo pela micropropagação (CASTRO et al., 2009).

Mudas produzidas *in vitro* representam uma alternativa viável para minimizar a disseminação de doenças, apresentando como vantagens a produção de mudas em espaço físico reduzido, alta qualidade fitossanitária e genética, assim como facilidade de transporte e uniformidade no desenvolvimento das plântulas (ALVES et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). Contudo, esta técnica, além de produzir mudas livres de patógenos por serem cultivadas em condições axênicas, priva a plântula de sua microflora natural e benéfica (LINS et al., 2003).

O desenvolvimento vegetal envolve a ação de reguladores de crescimento. Tais substâncias são caracterizadas em cinco principais grupos (auxinas, giberilinas, citocininas, etileno, ácido abscísico) baseados em sua estrutura química e efeitos fisiológicos. Entre as auxinas, destaque-se o ácido indol-3-ácetico (AIA) (KHAKIPOUR et al., 2008). Em substituição ao AIA, reguladores de crescimento sintéticos, como o ácido naftalenoacético, são empregados no processo de produção de mudas micropropagadas.

As rizobactérias são microrganismos que crescem próximos às raízes, influenciadas pelos exsudatos radiculares (COMPANT et al., 2005; DANTAS et al., 2009). Efeitos benéficos promovidos pelas rizobactérias envolvem mecanismos que podem atuar de forma direta, tais como a produção de reguladores de crescimento vegetal ou análogos a estes, a capacidade de solubilização de fosfatos, a fixação biológica de nitrogênio, a síntese de sideróforos, entre outros (LUZ, 2001; AMORIM e MELLO, 2002; OLIVEIRA et al., 2003). De forma indireta, aspectos que versam sobre o biocontrole de fitopatógenos estão envolvidos (SILVA et al., 2004).

A introdução de bactérias produtoras de AIA no processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira via tratamento de explantes e/ou na fase de aclimatização, pode promover o crescimento das futuras plântulas, interferindo na indução e na diferenciação do sistema radicular vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004),

no aumento da massa das raízes, com o estímulo do alongamento radicular e de raízes laterais, podendo, assim, reduzir o tempo para sua obtenção, além de protegê-las contra doenças quando em campo (BORGES e SOUZA, 2004).

Obtenção e seleção de rizobactérias produtoras de ácido indolacético

As informações desta circular foram validadas para as variedades 'Prata Anã' e 'Prata Comum', portanto, as recomendações aqui indicadas foram testadas para esses genótipos, desde a etapa de isolamento; mas podem ser validadas para outras variedades, seguindo os procedimentos indicados.

Bactérias devem ser isoladas de amostras de solo rizosférico de bananeiras com no mínimo um ano de cultivo, desde que apresentem bom aspecto fitossanitário. O isolamento de bactérias rizosféricas é realizado a partir de 10 g de solo, transferidos para Erlenmeyer, contendo 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) esterilizada, adicionando-se 2 gotas de Tween 80. A amostra é mantida sob agitação contínua por 30 minutos em temperatura ambiente, a partir do qual se procede a diluição seriada fator 10. Aliquotas de 100 μ L das diluições são transferidas para placas de Petri contendo meio Nutriente-Agar (NA), procedendo-se o espalhamento com alça de Drigalsky. A seguir as placas são incubadas a 28 °C por até 48h, e colônias individualizadas são coletadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio NA.

Preferencialmente os isolados obtidos devem ser preservados a -80 °C, sendo esta a fonte microbiana principal para a utilização nos trabalhos. A preservação das rizobactérias deve ser realizada adicionando-se aos tubos, após 24h de crescimento bacteriano, 2,0 mL de meio NBY (nutrient broth yeast extract) (SCHAAD, 1998) contendo glicerina (15 %), e agitados em seguida. A suspensão então é transferida para tubos criogênicos e armazenados a -80 °C.

Ensaio qualitativos para a detecção da produção de ácido indolacético (AIA) pelas bactérias devem ser realizados, segundo Cattelan (1999). Para isso, os isolados são transferidos para placas de Petri contendo meio TSA 1/10 enriquecido com 5mM de L-Triptofano (1,021 g L⁻¹). Em seguida, as placas são cobertas com membrana de nitrocelulose e incubadas a 28 °C por 24 h. Decorrido esse

intervalo, as membranas são removidas e saturadas com solução de Salkowski (GORDON e WEBER, 1951). A presença de halo avermelhado na membrana, no período entre 30 minutos e 2 horas caracteriza o isolado em teste como positivo para produção de AIA.

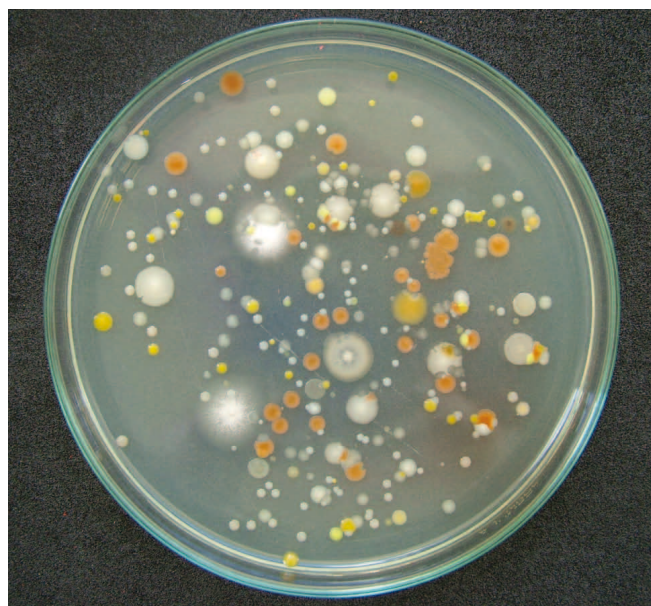


Foto: Harllen Sandro Alves Silva

Figura 1. Colônias de rizobactérias isoladas a partir de solo de cultivo de bananeira.

Uma avaliação quantitativa da produção de AIA pelas rizobactérias selecionadas deve ser realizada tomando-se alíquotas de 500 μ L de uma suspensão aquosa de cada um dos isolados, ajustadas para OD₅₄₀ = 0,5, colocadas para crescimento em 20 mL de meio DYGS (2,0 g extrato de levedura; 1,5 g peptona bacteriológica; 2,0 g glicose; 0,5 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄ · 7H₂O; 1,5 g ácido glutâmico; 1000 mL água destilada) e incubadas por 24 horas a 28 °C. Após esse período, 15 mL de cada uma das culturas homogeneizadas são transferidos para tubos e centrifugados a 10.016 g por, 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante obtido, 3 mL são vertidos em frascos, aos quais se adicionam 2 mL de reagente de Salkowski (SARWAR e KREMER, 1995). Os frascos com o sobrenadante e o reagente de Salkowski ficam mantidos por 30 min em ambiente escuro, para desenvolvimento de cor, que se apresenta rósea mais intensa quando há maior quantidade de ácido indolacético. A intensidade da cor é determinada em espectrofotômetro a 535 nm (ASGHAR et al., 2002). Estima-se a concentração dos compostos indólicos por meio de uma curva-padrão, previamente preparada com meio de cultura esterilizado apenas, e quantidades conhecidas de ácido indolacético de 0,

25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de acordo com a equação $y = 0,0514x - 0,0546$ ($R^2 = 0,9706$).

Isolados com produção de AIA entre 5,5 e 10 mg mL^{-1} devem ser a escolha final, e empregados no processo de produção de mudas micropropagadas.

Foto: Elizabeth Maria Ramos

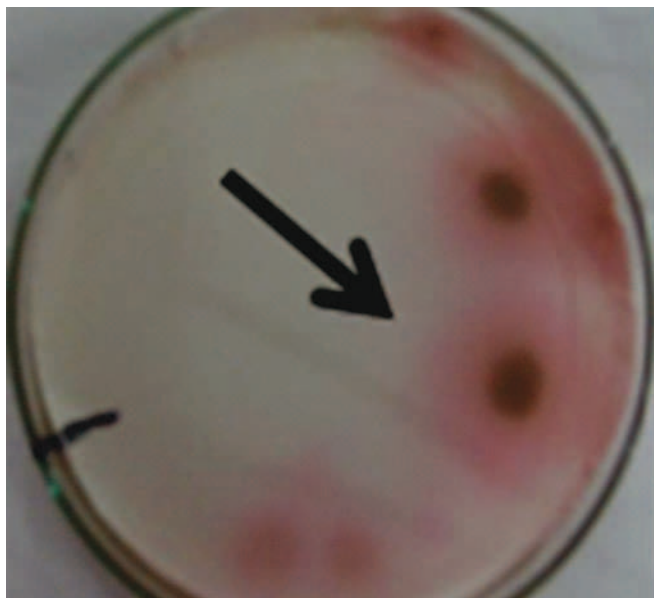


Figura 2. Ensaio de produção de ácido indolacético (AIA) *in vitro* por rizobactérias. Halo avermelhado em torno da colônia indica isolado produtor de AIA.

Aplicação de bactérias produtoras de AIA em explantes de bananeira

Bactérias produtoras de AIA devem ser empregadas isoladamente para o tratamento de explantes de bananeira. Para isso, uma suspensão aquosa do isolado deve ser obtida a partir de colônias com 24 horas de crescimento a 28 °C em meio nutriente-agar, e ajustada para 10^9 UFC mL^{-1} . Os explantes devem ser tratados por imersão em 50 mL da suspensão de células bacterianas, por 1 minuto, quando a seguir são transferidos para frascos de vidro contendo 60 mL de meio cultivo, composto de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 25 % de 1,35 μM do ácido naftalenoacético (ANA); 10 g.L^{-1} de sacarose, e adicionado de 4,7 g.L^{-1} de Agar esterilizado a 120°C por 20 min. Os frascos devem ser mantidos em estufas tipo PAD & FAN, com controle de temperatura 25 – 30 °C e umidade 80%, tendo como fonte de luz a irradiação solar. Após período de 20-25 dias, os explantes estão enraizados e prontos para passar à fase de aclimação.

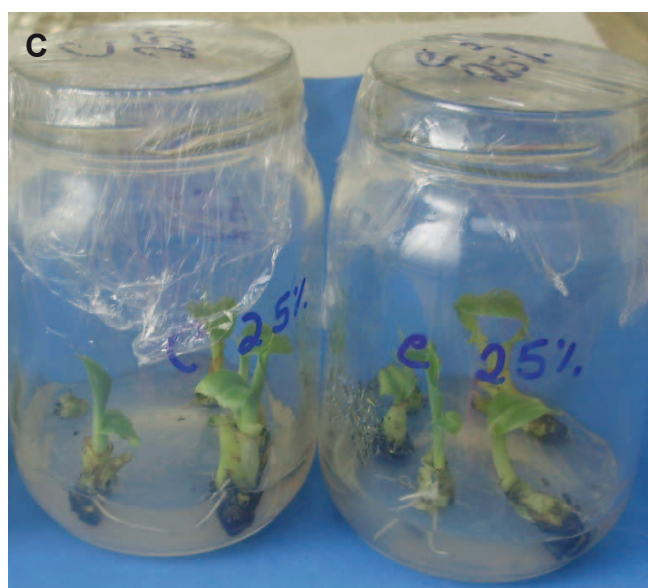


Figura 3. Enraizamento de explantes de bananeira tratados com bactérias produtoras de ácido indolacético. A – Microbiolização dos explantes; B – Explantes transferidos para meio de enraizamento; C – Explantes enraizados após 20 dias.

Fotos: Rosiane Silva Vieira

Aplicação de rizobactérias produtoras de AIA em mudas na fase de aclimatização

Explantos enraizados e seguindo para a fase de aclimatização são transferidos para tubetes plásticos de 19 cm de altura por 5,4 cm de largura, contendo uma formulação de substrato composta de 1 parte de substrato vegetal Plantmax estaca: 1 parte de pó de fibra de coco, adicionados de 0,2 % da fórmula PG MIX® e 0,2 % da fórmula OSMOCOTE®. A aplicação das rizobactérias individualmente, ou como uma combinação de isolados deve ser concomitantemente e 30 dias após o transplantio. Em ambas as situações, o tratamento das mudas

deve acontecer por rega do substrato adicionando-se 50 mL de uma suspensão aquosa contendo as bactérias, na concentração de 10^9 ufc. mL⁻¹. Para a aplicação das rizobactérias combinadas, há que se realizar um ensaio prévio de antibiose recíproca, para garantir que não haja produção de compostos antimicrobianos entre os isolados que afetem seu crescimento. Recomenda-se o emprego de até cinco isolados diferentes.

Os tubetes devem permanecer em casa de vegetação, irrigados diariamente, para o desenvolvimento das mudas. A partir de 50 dias, após o transplantio, as mudas já se encontram prontas para a comercialização.

Foto: Kaliane Sirio Araújo



Foto: Harlien Sandro Alves Silva



Foto: Harlien Sandro Alves Silva



Foto: Harlien Sandro Alves Silva



Figura 4. Aplicação de rizobactérias produtoras de AIA em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimatização.

A – Suspensão bacteriana a ser aplicada ao substrato de cultivo contendo explantes enraizados; B – Explantes enraizados após o transplantio; C – Mudas em desenvolvimento; D – Mudas prontas para a comercialização.

Considerações Finais

O processo descrito promove uma redução de 10 a 20 dias no tempo de enraizamento, fator altamente desejável pelas companhias produtoras de muda, como forma de reduzir custos. Aliada a isso, a possibilidade de redução da aplicação de fatores de crescimento ao meio (VIEIRA, 2012). Deve-se, porém, atentar ao fato de que a microbiolização significa uma etapa a mais no protocolo de produção de mudas, o que pode acarretar dificuldades operacionais e, conseqüentemente, aumento de custos.

Porém, os bons resultados obtidos quando as rizobactérias são aplicadas na fase de aclimatização, com redução do tempo de produção das mudas, sem prejuízo às mesmas, podem possibilitar o uso dos isolados em processos de irrigação, via um formulado de células bacterianas. Adiciona-se a isso a inserção de microrganismos, pela combinações de isolados, com outras características benéficas, como para fins de biocontrole de doenças. Essa proposta poderá gerar mudas com uma boa carga microbiana agregada, favorecendo sua adaptação ao meio em que serão cultivada. Estudos sobre o comportamento ecológico dos micro-organismos inseridos nesse processo podem ser realizados, de modo a possibilitar ferramentas de manejo que favoreçam seu estabelecimento no campo.

Referências Bibliográficas

- ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: **O cultivo da bananeira**, A.L. Borges e L.S. Souza (Eds.). Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.
- AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. M. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.
- ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.
- BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. **O cultivo da banana**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.
- CASTRO, A. C. R. de. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 385, 2009.
- CATTELLAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 1999. 36p.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.
- DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P.; FARIAS, M. F.; NOGURIRA, V. F. B. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 2, n. 2, p. 157-162, 2009.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1951.
- KHAKIPOUR, N.; KHAVAZI, K.; MOJALLALI, H.; PAZIRA, E.; ASADIRAHMAN, H. Production of Auxin Hormone by Fluorescent *Pseudomonads*. **American-Eurasian Journal Agriculture e Environmental Science**, v. 4, n. 6, p. 687-692, 2008.
- LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Mandioca e Fruticultura. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas). 182p. 2003.
- LINS, G. M. L.; TRINDADE, A. V.; ROCHA, H. S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estágios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 143-147, 2003.
- LUZ, W. C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 597-600, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-479, 1962.
- NELSON, C. S.; PLOETZ, C. R.; KEPLER, K. A. USA species (banana and plantain) Musaceae (banana family). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. 2006. Disponível em: www.traditionaltree.org

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Embrapa Agrobiologia**, Itaguaí, RJ, 2003. 40p.

PEREIRA, M. C. T.; NIETSCH, S.; FRANÇA, A. C.; NUNES, C. F.; GONÇALVES, C. L.; GONÇALVES, V. D.; SALLES, B. P.; MORAIS, D. L. B.; KOBAYASHI, M. K. Aclimação de mudas micropropagadas de bananeira sob condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 238-240, 2005.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.

SCHAAD, N. W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: **American Phytopathological Society**. 1998. 164p.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D. ; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, p. 288–295, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. Ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2004. 722p.

VIEIRA, R. S. **Aplicação de rizobactérias e bactérias endofíticas para a promoção do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA. Dissertação de Mestrado. 2012. 54p

Circular Técnica, 117

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Endereço: Rua Embrapa, s/n, Caixa Postal 07,
44380-000, Cruz das Almas - Bahia
Fone: (75) 3312-8000
Fax: (75) 3312-8097
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac/
www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura

1ª edição
(2016): online

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Aldo Vilar Trindade
Secretária: Lucidalva Ribeiro G. Pinheiro
Membros: Antonio Alberto Rocha Oliveira, Aurea Fabiana Apolinário de Albuquerque, Cláudia Fortes Ferreira, Harllen Sandro Alves Silva, Herminio Souza Rocha, Jacqueline Camolese de Araújo, Marcio Eduardo Canto Pereira, Tullio Raphael Pereira de Pádua, Léa Ângela Assis Cunha

Expediente

Supervisão editorial: Aldo Vilar Trindade
Normalização bibliográfica: Lucidalva Ribeiro G. Pinheiro
Editoração: Anapaula Lopes e Victor Pereira Brito